

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Kateřina Kratochvílová**

Použití vektorů odvozených od rostlinných virů pro expresi proteinů v rostlinách

The use virus derived vectors for the expression of proteins in plants

**Bakalářská práce**

Školitel: Mgr. Tomáš Moravec, Ph.D.

Praha 2016

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla veškeré použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 19.8.2016

Podpis:.....

## **Poděkování:**

Chtěla bych moc poděkovat Mgr. Tomáši Moravcovi, Ph.D. za vedení mé bakalářské práce, za všechny cenné rady, vstřícnost a neméně za všechnen čas věnovaný této práci.

Dále bych chtěla poděkovat svému příteli, rodině a nejbližším přátelům za podporu kterou mi poskytli během psaní této práce.

## **Abstrakt**

Virus tabákové mozaiky (TMV) je jedním z nejprozkoumanějších virů vůbec a jeho vlastnosti (např. jednoduchost, schopnost samosbalování (self assembly) virové kapsidy, tvar, schopnost rychle se množit v širokém zastoupení hostitelů) nabízí široké využití v různých biologických odvětvích. Genové vektory, založené na viru tabákové mozaiky představovaly, a i v dnešní době stále představují, velmi dobrý způsob pro expresi proteinů v rostlinách. Protože je virus tabákové mozaiky velmi dobře prozkoumán a velké množství vlastností a dějů, které v něm probíhají již bylo objeveno, ubírá se v dnešní době jeho zkoumání hlavně směrem k využití v nanotechnologických odvětvích. A to nejen jako templátu pro tvorbu nanočástic, ale jsou otevřeny i možnosti pro potenciální využití tohoto viru pro výrobu vakcín v rostlinách. V této práci jsem shrnula dosud známé informace o procesu self assembly viru tabákové mozaiky a poukázala na možnosti využití tohoto viru v nově se rozvíjejících oborech biologie.

## **Klíčová slova**

Virus tabákové mozaiky, sbalování virové částice, virový vektor, nanotechnologie

## **Abstract**

The tobacco mosaic virus (TMV) is one of the most studied virus. Its properties (simplicity, self assembly of viral capsid, the ability to proliferate in a large variety of hosts) offers a lot of applications in various scientific or biological fields. Gene vectors based on the tobacco mosaic virus represent a very good way for expressing proteins in plants. Because the tobacco mosaic virus is well researched and a large number of his properties have already been discovered, it is used for nanotechnologic sectors in this period. Not only for the formation of nanoparticles, but also for example for a potential production of vaccines in plants. In this paper, I summarize the known information about the process of self assembly of tobacco mosaic virus and the possibility of using this virus in the emerging fields of biology.

## **Key words**

Tobacco mosaic virus, self assembly, viral vector, nanotechnology

## Seznam použitých zkratek

<b>AVČR</b>	The Czech Academy of Science	Akademie věd České republiky
<b>cDNA</b>	Complementary deoxyribonucleic acid	komplementární deoxyribonukleová kyselina
<b>CP</b>	Coat protein	obalový protein
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic acid	deoxyribonukleová kyselina
<b>ER</b>	Endoplasmic reticulum	endoplasmatické retikulum
<b>GFP</b>	Green fluorescent protein	zelený fluorescenční protein
<b>MP</b>	Movement protein	pohybový protein
<b>NA</b>	Nucleic acid	nukleová kyselina
<b>NIH</b>	National Institutes of Health	Americký Národní institut zdraví
<b>NTR</b>	Non-transcribed region	nepřekládaná oblast
<b>ORF</b>	Open reading frame	otevřený čtecí rámec
<b>PEG</b>	Polyethylene glycol	polyethylen glykol
<b>pH</b>	Potential of hydrogen	potenciál vodíku
<b>PVX</b>	Potato virus X	X virus bramboru
<b>RNA</b>	Ribonucleic acid	ribonukleová kyselina
<b>ssRNA</b>	Single stranded ribonucleic acid	jednovláknová ribonukleová kyselina
<b>TEM</b>	Transmission Electron Microscopy	Transmisní elektronová mikroskopie
<b>TMV</b>	Tobacco mosaic virus	virus tabákové mozaiky
<b>tRNA</b>	Transfer ribonucleic acid	transferová ribonukleová kyselina
<b>VLP</b>	Virus like particles	viru podobná částice
<b>WHO</b>	World Health Organisation	Světová zdravotnická organizace
<b>WT</b>	Wild type	divoký kmen

# Obsah

1. Úvod .....	1
2. Virus tabákové mozaiky .....	3
2.1. Taxonomie viru .....	3
2.2. Historie .....	3
2.3. Struktura virové částice .....	4
2.4. Organizace genomu .....	4
2.5. Replikační cyklus .....	5
3. Vektory odvozené od rostlinných virů .....	6
3.1. Virové vektory první generace .....	7
3.2. Virové vektory druhé generace .....	7
4. Sbalování virové částice u TMV .....	9
4.1. Základní charakteristika mechanismu sbalování virové částice .....	9
4.2. Struktura a slučování disků v in vitro podmínkách .....	9
4.3. Struktura obalového proteinu (CP).....	10
4.4. Interakce TMV RNA s obalovým proteinem <i>in vitro</i> .....	11
4.5. Proces sbalování viru tabákové mozaiky <i>in vitro</i> .....	11
4.6. Uvolnění RNA z virové částice in vitro .....	12
4.7. Proces sbalování viru tabákové mozaiky <i>in vivo</i> .....	12
5. Využití assembly částice TMV v rozvíjejících se biologických oborech.....	16
5.1. Nanotechnologie.....	16
5.1.1. Částice obsahující kovové prvky .....	16
5.2. Medicínské využití .....	17
5.2.1. Využití při léčbě a diagnostice nemocí.....	17
5.2.2. Vakcinace, využití při přípravě vakcín.....	17
6. Závěr.....	19
7. Seznam použité literatury a zdrojů .....	21
8. Seznam použitých ilustrací.....	25

## 1. Úvod

Viry jsou malé mikroskopické částice, které vždy obsahují nukleovou kyselinu (ss/dsRNA nebo ss/dsDNA) a proteiny, které ji chrání. Replikace virů probíhá ve většině případů za použití enzymatického aparátu hostitelských buněk, proto se viry často označují jako obligátní vnitrobuněční parazité. Nejsou schopny samostatně se dělit a dlouhodobě přežívat bez svého hostitele. Nesplňují tak definici živých soustav a nemůžeme je proto označit za živé organismy. Stojí na pomezí mezi živými a neživými systémy.

Již od objevení viru jako samostatné entity se myšlenky lidstva ubírají k tomu, odkud se viry vzaly a jestli jsou vůbec živé. Existuje mnoho teorií, které vysvětlují jejich vznik, ale ani jedna z nich není plně doložena a v dnešní době zcela uznávána. Jisté ale je, že se viry vyvinuly velmi brzy v evoluci života a jsou schopny infikovat buňky všech tří domén života: Archaea, Bacteria a Eukarya.

I přes to, že jsou viry významnými patogeny živých organismů a způsobují celou řadu vážných onemocnění, byla díky jejich zkoumání objevena spousta buněčných dějů nebo biologických struktur na molekulární úrovni. Člověk se některé z nich naučil využívat ve svůj prospěch a díky biologickému poznání jsou mnohé hojně využívány v různých chemicko-biologických odvětvích.

Tato práce se v celém svém rozsahu zabývá virem tabákové mozaiky, jeho vlastnostmi, strukturou a využitím. Velmi důležitou roli v poznání a následném využití ve prospěch lidstva hraje proces samouspořádávání (self assembly) virové kapsidy.

Samouspořádávání (self assembly) virové kapsidy je proces, při kterém se obalové proteiny (coat proteiny, CP) uspořádávají do helikální struktury virové částice kolem molekuly RNA. Tyto proteiny chrání virovou nukleovou kyselinu (NA) v prostředí mimo hostitelskou buňku, což je klíčové pro zachování infekivity viru. Mechanismus vzniku virových částic je studován téměř celé století, přesto zůstává mnoho detailů neobjasněných.

Použití viru jako vektoru pro přenos cizorodých genů do rostlinných buněk rostlin hraje v biologických disciplínách téměř stejně důležitou roli jako proces vzniku částic. Vektory odvozené od viru tabákové mozaiky mají mnoho výhod, jako například relativní jednoduchost, vysokou úroveň exprese, rychlost, odolnost k silencingu, široký hostitelský rozsah a v neposlední řadě i velké množství znalostí o základní biologii tohoto viru.

Cílem práce je shrnout již existující informace o molekulární podstatě interakce RNA viru tabákové mozaiky s obalovým proteinem a nastítnit starší i aktuální poznatky týkající se sestavování virových částic v podmínkách *in vitro* a *in vivo*.



## 2. Virus tabákové mozaiky

### 2.1. Taxonomie viru

Virus tabákové mozaiky je částice s jednoduchou tyčinkovitou strukturou a ssRNA genomem s kladnou polaritou. Řadíme ho do skupiny *Virgaviridae* a rodu *Tobamovirus*. Do stejného rodu můžeme spolu s virem tabákové mozaiky zařadit například Tomato mosaic virus, Cucumber green mottle mosaic virus, Pepper mild mottle virus nebo Odontoglossum ringspot virus.

### 2.2. Historie

Virus tabákové mozaiky dnes patří k nejprozkoumanějším virům a historie jeho poznávání sahá hluboko do dějin. Pokusy na něm prováděné hrály důležitou roli při rozvoji molekulární biologie a virologie jako takové. První zmínky můžeme najít již v roce 1886, kdy A. Mayer ve své práci poprvé pozoroval a popsal rostlinnou chorobu, kterou tehdy nazval „*tabáková mozaika*“ (Harrison & Wilson, 1999). V návaznosti na toto pozorování provedl Beijerinck roku 1898 experimenty založené na filtraci rostlinných šťáv a tabákovou mozaiku jako infekční agens poprvé nazval virem (Beijerinck, 1898).

Již v roce 1939 byla díky práci G. Kauscheho pozorována tyčinkovitá struktura virové částice pod elektronovým mikroskopem. Toto pozorování bylo provedeno na viru tabákové mozaiky (TMV) vůbec poprvé v historii (Kausche *et al.*, 1939).

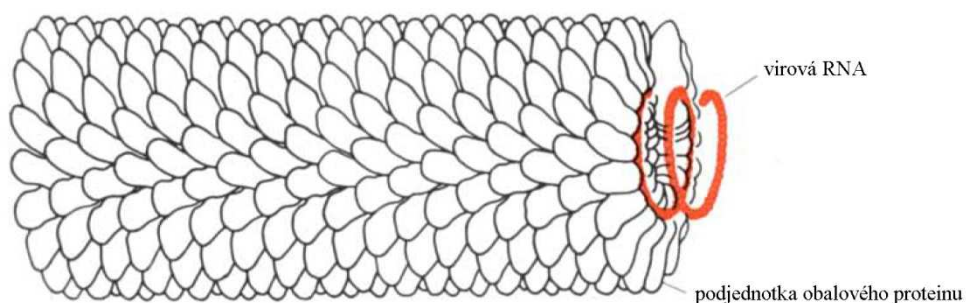
Zkoumání viru tabákové mozaiky (TMV) šlo v průběhu let téměř vždy ruku v ruce s průlomovými objevy v biologii. Důkazem toho může být například zaznamenání procesu skládání strukturních podjednotek do helikální virové částice J. Watsonem 1954, tedy o rok později, než byla objasněna struktura molekuly DNA (Watson, 1954). Za zmínku stojí i významné pokusy R. Franklin, která roku 1957 ve své práci navrhla s využitím metody X-ray uspořádání RNA a obalového proteinu. Její výzkumy významným dílem pomohly k objasnění chemické struktury virových částic tabákové mozaiky a molekulární struktury kódovaných proteinů (Franklin *et al.*, 1957, Franklin & Klug, 1955).

70. léta 20. století patřila ve výzkumu TMV popisu mechanismu sbalování virové částice a pozorování interakce virové RNA s obalovým proteinem. Roku 1982 byl u TMV jako u prvního organismu vůbec osekvenován celý genom (Goelet *et al.*, 1982).

### 2.3. Struktura virové částice

Virus tabákové mozaiky (TMV) je jedním z nejjednodušších virů. Jeho virion má jednoduchou tyčinkovitou strukturu složenou z proteinových podjednotek, které se uspořádávají helikálně. Uvnitř této struktury najdeme nukleovou kyselinu (NA), konkrétně molekulu RNA, svinutou stejně jako obalové proteiny do helikální struktury (Klug, 1979).

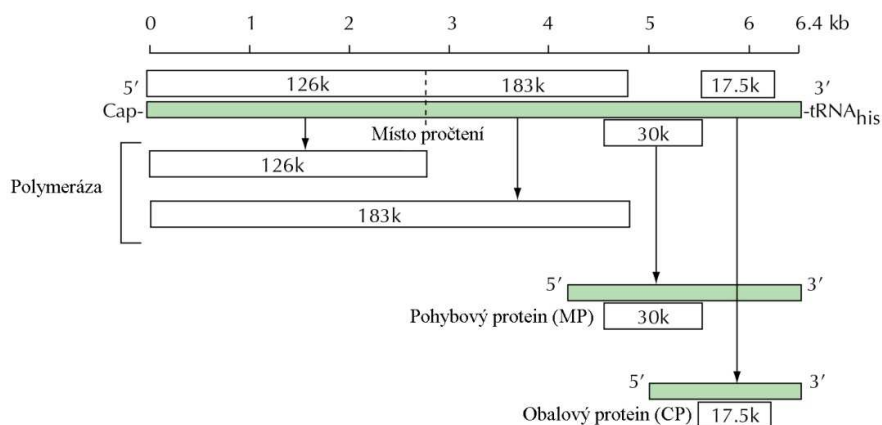
Délka jedné virové částice se pohybuje kolem 300 nm (Fraenkel-Conrat & Williams, 1955). Šířka částice je 18 nm a průměr vnitřního kanálu okolo 4 nm. Jedna podjednotka obalového proteinu se váže na 3 RNA nukleotidy a jedna virová částice se tak skládá z 2133 podjednotek (Butler, 1999).



Obrázek 1: Struktura virové částice viru tabákové mozaiky (TMV)  
Převzato a upraveno z Butler & Klug (1978)

### 2.4. Organizace genomu

Genomová informace TMV má velikost zhruba 6,4 kb a nese informaci pro čtyři polypeptidy: polymerázu, která je kódována dvěma otevřenými čtecími rámci (ORF), pohybový protein (movement protein, MP) a strukturní obalový neboli plášťový (coat protein, CP) protein. Na 5' konci nese RNA methylovou čepičku (cap strukturu) a 68 nukleotidů dlouhou 5' NTR oblast, tzv. Omega enhancer. Na 3' konci je 204 nukleotidů dlouhá nekódující sekvence (3'NTR oblast), která má strukturu podobnou tRNA a postrádá polyA konec (Guilley *et al.*, 1979; Sleat *et al.*, 1987; Cann, 2005).



Obrázek 2: Struktura genomu viru tabákové mozaiky (TMV).  
Převzato a upraveno z Cann (2005).

## 2.5. Replikační cyklus

Replikační cyklus (+) RNA virů je charakteristický i pro TMV. Prvním krokem je vstup viru do rostlinné buňky, ke kterému dochází po mechanickém poškození pletiva. Virus nemá žádný známý vektor. V cytoplazmě hostitelské buňky dochází k disociaci virové kapsidy z virové RNA a následné replikaci pomocí hostitelského aparátu. Proces replikace probíhá v cytoplazmě v membránových strukturách odvozených z endoplasmatického retikula (ER) tzv. viroplazmatech neboli replikačních továrnách (replication factories) (Más & Beachy, 1999; Osman & Buck, 1996).

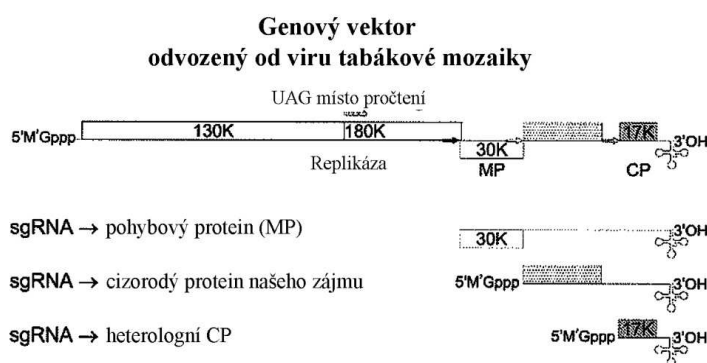
V těchto strukturách dochází také k iniciaci vzniku nových virových částic. Pro pohyb viru mezi buňkami není tvorba částic nezbytná. Virus se může do sousedních buněk šířit pomocí plazmodezmat buď ve formě RNA, nukleoproteinových komplexů, nebo dokonce celých viroplazmat (Kawakami *et al.*, 2004). Tento pohyb mezi buňkami je zprostředkován virovým pohybovým proteinem (movement protein, MP), který se váže na plasmodesmata. Molekulární dráhy kterými pohybový (MP) protein interaguje s hostitelskou buňkou jsou ale do značné míry stále neobjasněné (Boevink & Oparka, 2005; Chen *et al.*, 2000). Virové částice jsou však nezbytné pro systémové šíření viru vodivými pletivy a pro šíření infekce mezi rostlinami.

### 3. Vektory odvozené od rostlinných virů

Rostliny mohou být infikovány viry z mnoha různých taxonomických skupin, jejichž genom může být založen jak na DNA tak i RNA, nicméně převažující většina rostlinných virů je založena na genomu s pozitivní ssRNA (King, 2012). Rostliny jsou výhodnými modelovými organismy jakož i vhodnou platformou pro expresi pomocí virových vektorů. Jsou schopny produkovat velké množství biomasy, přičemž vyžadují pouze jednoduché vstupy (světlo, oxid uhličitý, dusík a další minerální živiny) a jejich pěstování většinou nevyžaduje složitou a drahou infrastrukturu (Porta & Lomonossoff, 2002).

Rostlinné viry jsou díky svým vlastnostem vhodné pro využití při tvorbě genových vektorů. K jejich rozvoji došlo již na začátku 90. let s rozvojem molekulární biologie a dostupnosti prvních úplných infekčních cDNA klonů (Dawson *et al.*, 1986; Holt & Beachy, 1991). Jejich rozvoj byl zpočátku poněkud omezen náročnou prací s dlouhými RNA molekulami, ale tyto technické obtíže byly brzy překonány.

Virus tabákové mozaiky je pro své vlastnosti poměrně často využíván. Nabízí mnohé výhody: velmi rychle se množí, dosahuje obrovských titrů v napadených rostlinách, částice jsou mimořádně stabilní, má poměrně široký hostitelský rozsah (Shivprasad *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2003). Jeho genom obsahuje oddělené ORF (otevřený čtecí rámeček) pro polymerázu, movement protein (MP) i coat protein (CP). Cizorodý gen našeho zájmu, který chceme přenášet tak může být vložen pod zdvojený nehomologní promotor coat proteinu (CP) (Porta & Lomonossoff, 2002).



Obrázek 3: Schéma struktury genomového složení wild-typu viru tabákové mozaiky (TMV).

Převzato a upraveno z Porta a Lomonossoff (2002)

### 3.1. Virové vektory první generace

Virové vektory první generace byly založeny na úplné infekční cDNA kopii virového genomu, do které se na vhodné místo pomocí restrikčních enzymů vložil dodatečný gen. Ten byl poté exprimován, nejčastěji pomocí silného virového promotoru pro obalový protein, případně ve fúzi s obalovým proteinem. Pro infekci rostlin se použije *in vitro* připravená RNA buď přímo, nebo *in vitro* enkapsidovaná do částic. Příprava inokula je velmi technicky náročná a finančně nákladná. To může být vyváжено tím, že některé konstrukty vytvářejí funkční virové částice a primárně infikovaná pletiva tak mohou být použita pro infekci dalšího materiálu. V případě vzniku funkčních částic se navíc virový vektor šíří systémově po celé rostlině, takže pro infekci jedné rostliny postačují malá množství viru, řádově jednotky  $\mu\text{g}$ . Takové vektory jsou omezeny tím, že pro praktické použití musí být zachována schopnost tvorby částic, což je na druhou stranu problematické z hlediska biologické bezpečnosti. Poměrně silný selekční tlak na zkrácení nepotřebných inzertů do genomu navíc omezuje počet možných pasážování virového vektoru (Gleba *et al.*, 2005; Marillonnet *et al.*, 2004; Gleba *et al.*, 2007)

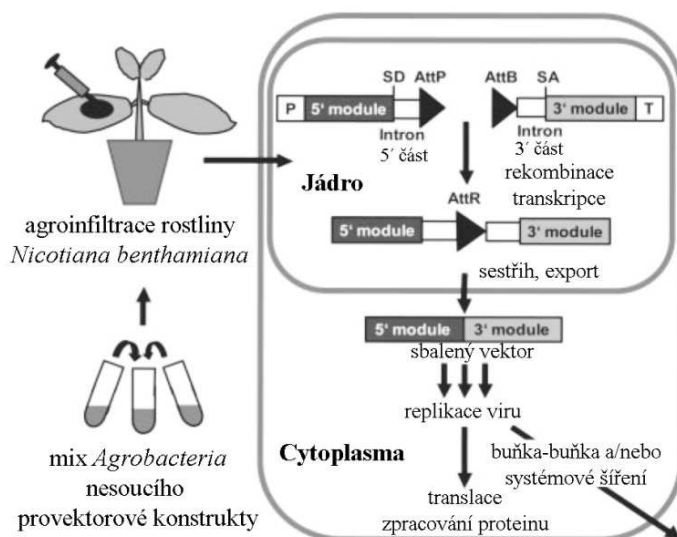
Použití těchto vektorů odvozených od vektoru TMV-30B (Shivprasad *et al.*, 1999) velmi důkladně rozpracovala společnost Large Scale Biology, která tuto technologii používala v polním (zemědělském) měřítku a dokonce vybudovala závod na zpracování infikovaného tabáku v Owensboro, Kentucky (Gleba *et al.*, 2013). Tento závod se po zániku společnosti dále rozšiřuje a nedávno na sebe opět upozornil jako místo, kde byla vyráběna protilátka proti viru Ebola ZMapp.

Virové vektory první generace byly použity i pro přípravu individualizované vakcíny proti myeloidní leukemii (McCormick *et al.*, 2008).

### 3.2. Virové vektory druhé generace

Díky rozvoji molekulární biologie byly vyvinuty další způsoby využití virových vektorů, které eliminovaly omezení generace prvních vektorů. U vektorů druhé generace se používá pro iniciaci virové infekce *Agrobacterium* a virová RNA je z DNA vytvořena až v rostlině. To zároveň umožňuje i rozdělení virových funkcí (replikace/pohyb z buňky do buňky/tvorba částic/ exprese vloženého genu) do jednotlivých plazmidů, které mohou být buď složeny do úplné RNA opět až v rostlinné buňce a nebo mohou být na samostatných genových elementech případně i zcela vynechány (Marillonnet *et al.*, 2005). U těchto vektorů není

zásadně důležitá tvorba částic a někdy ani pohyb mezi buňkami, infekce celé rostliny je snadno dosaženo vakuovou infiltrací celé rostliny do suspenze *Agrobacteria*. Díky vynechání některých elementů z replikující se molekuly RNA může být i zvětšena velikost vloženého transgenu. Nová generace infekčních klonů tak překonává mnohá omezení a to hlavně omezenou infekčnost a malou velikosti vkládaných fragmentů. Výraznou výhodou *in vitro* rekombinace virové RNA je snadné modulární klonování, kdy velkou část virového vektoru není nutno nijak měnit a pro vytvoření funkční virové RNA v rostlině se použije pouze směs kultur *Agrobacteria* s různými virovými elementy. Vektory druhé generace jsou také biologicky mnohem bezpečnější metodou. Zásadní podíl na vývoji této generace vektorů měla skupina prof. Dr. Gleby, Ph.D., která tuto sadu vektorů nazvala MagnIcon a techniku agroinfiltrace spojené s virovou infekcí nazvala MagnInfection (Gleba *et. al.*, 2005; Klimyuk *et al.*, 2012) Tato technika byla použita při výrobě zmiňované protilátky ZMapp.



Obrázek 4: Schéma infekce rostlin virovým vektorem na bázi TMV MagnIcon.

Převzato a upraveno z Marillonnet *et al.* (2004)

## 4. Sbalování virové částice u TMV

### 4.1. Základní charakteristika mechanismu sbalování virové částice

Všechny doposud známé informace o procesu samouspořádávání (self assembly) a rozkládání (disassembly) u viru tabákové mozaiky jsou čerpány z experimentů prováděných v prostředí *in vitro*. Z technických důvodů nebyl dosud tento proces příliš studován *in vivo*. Kromě jiného proto, že úsek RNA identifikovaný jako enkapsidační počátek je součástí genu pro pohybový protein (movement protein, MP) a modifikace tohoto počátku zastavují šíření viru z buňky do buňky. V současnosti jsou však k dispozici transgenní rostliny obsahující funkční gen MP, které jsou schopné komplementovat chybějící funkci virového genomu. Řešení otázky enkapsidace virové RNA *in vivo* bude pravděpodobně předmětem zkoumání v blízké budoucnosti (Zimmern & Butler, 1977; Matthews, 2013).

Proces sbalování virové částice (assembly) je děj, při kterém dochází k interakci virové RNA s molekulami obalového proteinu (coat protein, CP) za vzniku úplné obalené virové částice. Jednotlivé podjednotky obalového proteinu (CP) spolu interagují za vzniku 20S (odvozeno od sedimentačního koeficientu) (Shire *et al.*, 1979) proteinových agregátů tzv. disků, které hrají klíčovou roli v iniciaci procesu assembly. Disky se váží na RNA smyčku, kde je celý proces sbalování (assembly) iniciován (Caspar, 1963; Butler & Klug, 1971).

Jeden 20S agregát obsahuje 17 podjednotek obalového proteinu (CP) a současně  $16\frac{1}{3}$  podjednotek obalového proteinu (CP) na jednu otočku helixové struktury virové RNA. RNA celé částice dlouhé 300 nm je kompletně obalena podjednotkami obalového proteinu (CP). Celkem ji pokrývá asi 2100 podjednotek CP (Hwang *et al.*, 1994; Butler, 1999).

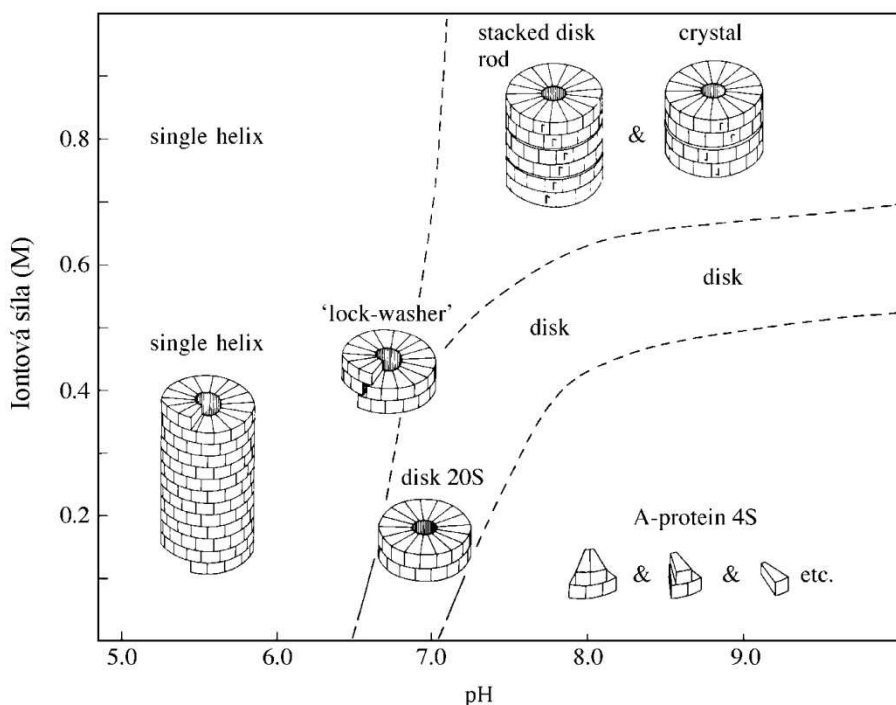
Délka virové částice je závislá na délce RNA. Dokud není virus dopraven dovnitř hostitelské buňky, zůstává RNA zcela obalená proteinovými podjednotkami (CP) z důvodů ochrany před možnou degradací. Po vstupu do buňky se ale RNA na 5' konci uvolní z proteinového obalu, naváže se na ni ribozomy a následně dochází k současnému rozbalování RNA a translaci (kotranslace) virové replikázy (Butler & Klug, 1978).

### 4.2. Struktura a slučování disků v *in vitro* podmínkách

Velkou roli při slučování obalového proteinu (CP) do struktury disků hraje pH okolního prostředí. V mírně zásaditém roztoku (pH vyšší než 7) mají obalové proteiny tendenci existovat převážně ve směsi malých shluků několika podjednotek označovaných jako protein A.

Při neutrálním pH (v blízkosti hodnoty 7) se obalové proteiny (CP) shlukují do specifických dvouvrstevných diskových struktur. V tomto případě se až 80 % obalových proteinů nachází zakomponováno do disků. Zbytek obalových proteinů tvoří A protein.

V kyselém prostředí (pH menší než 7) se obalové proteiny (CP) shlukují do specifických krátkých struktur nazývaných „lock washers“, které mají délku rovnající se dvěma otočkám helixu. Tyto struktury se na vzniku částic nepodílejí a časem se mohou spojovat do struktur podobných virovým částicím (virus like particles, VLP), které ale neobsahují RNA a nemají tak definovanou délku. Mohou být tedy i delší než je obvyklé pro virové částice TMV (Butler & Klug, 1978). Tyto rozdílné stavy při měnícím se pH jsou znázorněny na obrázku 5.



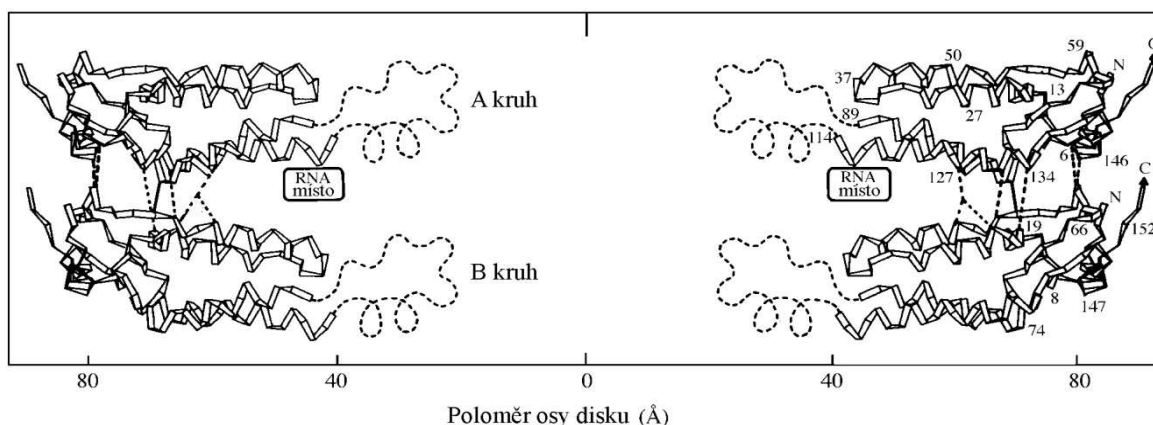
Obrázek 5: Shlukování jednotlivých podjednotek obalového proteinu (CP) do různých struktur v závislosti na pH okolního prostředí. Převzato a upraveno z Klug (1999)

### 4.3.Struktura obalového proteinu (CP)

Virový obalový protein obsahuje několik sekundárních struktur. Až 50% celkového zastoupení tvoří  $\alpha$ -helixy a 10 % struktury  $\beta$  skládaného listu. (Namba *et al.*, 1989). Hlavní podpůrnou část proteinových agregátů tvoří čtyři antiparalelní  $\alpha$ -helixy.

Mezi vrstvami disku (dvouvrstvá struktura) se s největší pravděpodobností nachází vazebné místo pro virovou RNA viz. obrázek 6 (Butler *et al.*, 1977).





Obrázek 6: Schéma struktury čtyř antiparalelních  $\alpha$  helixů, které jsou hlavní podpůrnou částí agregátů. Nachází se zde i RNA vazebné místo.

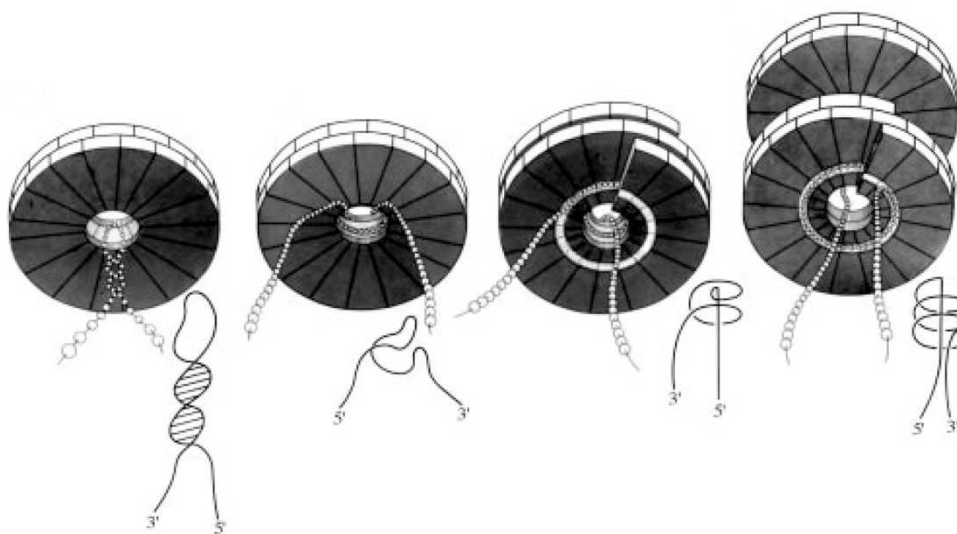
Převzato a upraveno z Klug (1999)

#### 4.4. Interakce TMV RNA s obalovým proteinem *in vitro*

V blízkosti 3' konce virové RNA se nachází tzv. počátek sbalování (origin of assembly, OAS), jehož sekvence se nachází zhruba 900-1300 nukleotidů od 3' konce (Zimmern & Wilson, 1976). Délka této sekvence je kolem 300 nukleotidů a je orientovaná ve směru 3'→5'. Vytváří specifickou vlásenkovitou strukturu, která má na svém vrcholu specifickou sekvenci nukleotidů AAGAAGUCG (Zimmern, 1977). Toto místo je jako první rozeznáváno při vazbě RNA na proteinové disky složené z CP. Sekvence OAS je dostačující podmínkou pro specifickou interakci mezi CP a RNA a umožňuje tak enkapsidaci i jiných RNA, než genomové RNA viru. Tento fenomén byl využit pro tvorbu pseudovirionů v *E. coli* (Hwang *et al.*, 1994) nebo *in vitro* s živočišným RNA virem (Semliki forest virus) (Smith *et al.*, 2007). Na jednu podjednotku obalového proteinu připadají vždy tři nukleotidy virové RNA (Stubbs, 1977).

#### 4.5. Proces sbalování viru tabákové mozaiky *in vitro*

Vytvořená vlásenka obsahující počátek sbalování (OAS) je vtahována 5' koncem do středu 20S proteinového agregátu rostoucího helixu. 3' i 5' konec vyčnívají z centrální dutiny na jedné straně a prodlužování částice probíhá v obou směrech, liší se však rychlostí. Připojování obalových proteinů na 5' konec je mnohem rychlejší než prodlužování 3' konce. Růst virové částice je zastaven, když je celá RNA obalena proteiny (Butler, 1999; Okada & Ohno, 1972).



Obrázek 7: Možný model assembly virové částice (interakce RNA a obalového proteinu (CP)).  
Převzato a upraveno z Butler (1999).

#### 4.6. Uvolnění RNA z virové částice *in vitro*

Proces uvolnění RNA z virové částice (disassembly) byl v *in vitro* podmínkách zkoumán v mnoha různých prostředích, která způsobovala rozpad virové částice a umožnila tak jeho bližší popis.

V alkalickém prostředí byl tento děj popsán jako polární proces, při kterém probíhá disociace podjednotek obalových proteinů (CP) ve směru 5'→3', přičemž 5' konec je jako první destabilizován (Perham & Wilson, 1976). Když virion vystoupí do buňky hostitele, dojde k výraznému snížení koncentrace vápenatých iontů a protonů uvnitř cytoplasmy a vytvořený negativní náboj pravděpodobně destabilizuje virovou částici (Stubbs, 1999).

Při rozpadu (disassembly) virové kapsidy se vytváří stabilní meziprodukty různé délky, které stále částečně interagují s RNA. RNA v interakci s nejkratším a nejvýznamnějším intermediátem, který byl pozorován se nazývá PSV 6 (partially stripped virus) a je zhruba 1000 nukleotidů dlouhá (Perham & Wilson, 1978).

I přes to, že proces rozkládání (disassembly) virové kapsidy je již dlouhou dobu zkoumán, jeho detailní molekulární obraz stále chybí.

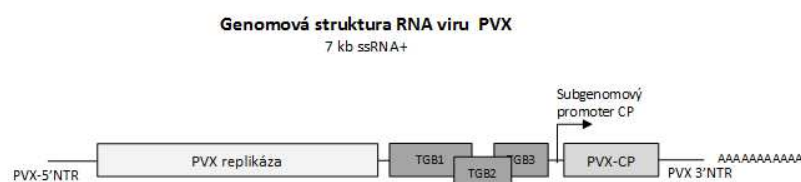
#### 4.7. Proces sbalování viru tabákové mozaiky *in vivo*

Zatímco proces sbalování virové kapsidy viru tabákové mozaiky v podmínkách *in vitro* byl zevrubně prostudován již před více než 30 lety, o průběhu vzniku částic během virové infekce je toho známo velmi málo. Toto téma bylo po dlouhou dobu mimo zájem vědců

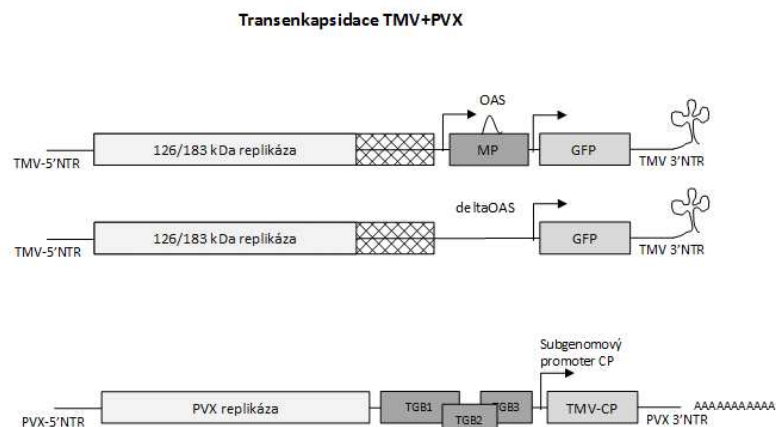
používajících virus TMV jako modelový organismus. Interakcí virové RNA s obalovým proteinem během virové infekce se zabývá mimo jiné i Laboratoř virologie Ústavu experimentální botaniky AV ČR pod vedením Mgr. Tomáše Moravce, PhD.

V této laboratoři byly provedeny série pokusů, které naznačují, že proces sbalování virové částice v rostlině (*in vivo*) může probíhat po jiné trajektorii než proces popsáný v umělých podmínkách *in vitro*. Původním smyslem experimentů bylo vytvořit v rostlině systém pro specifickou enkapsidaci libovolné RNA, pomocí několika nepříbuzných rostlinných virových vektorů. V první sadě experimentů byl použit vektor odvozený od TMV, bez obalového proteinu, který byl nahrazen GFP markerem. Spolu s ním byly rostliny infikovány PVX vektorem, jehož vlastní obalový protein byl nahrazen TMV obalovým proteinem (viz obr. 9). V tomto uspořádání dle předpokladu dochází ke vzniku částic obsahující TMV genom a TMV obalový protein, genom PVX nebyl v částicích detekován.

V dalším kroku byl z vektoru TMV odstraněn i gen pro virový pohybový protein, který zahrnuje rovněž OAS sekvenci. Nicméně i přes odstranění OAS, stále vznikaly částice obsahující TMV genomovou RNA a TMV obalový protein, které umožňovaly systémové šíření viru a jeho přenos na citlivé (MP transgenní) rostliny (Moravec, Laboratoř virologie AVČR, dosud nepublikované výsledky).



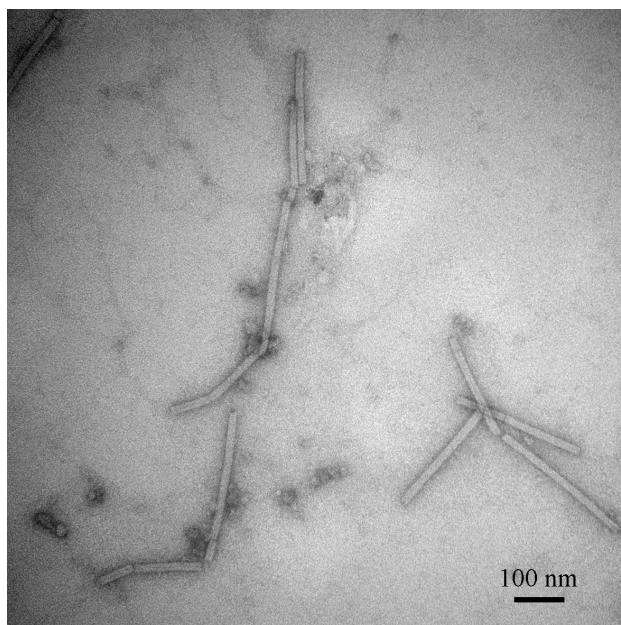
Obrázek 9: Genomová struktura RNA viru PVX (X virus bramboru)  
Převzato z Moravec, Laboratoř virologie AVČR (dosud nepublikované výsledky).



Obrázek 8: Schéma virových vektorů použitých pro testování sbalování virových částic *in vivo*. Rostlinné buňky jsou vždy infikovány dvěma rostlinnými viry – vektorem s TMV genomem, který místo vlastního CP nese vizuální marker GFP a buď obsahuje OAS nebo nikoliv, a druhým pomocným vektorem s genomem PVX, který rovněž neobsahuje vlastní CP a nemůže se šířit samostatně rostlinou. Produkuje ale TMV CP. V obou případech vznikají virové částice obsahující TMV CP a TMV RNA genom.

Převzato z Laboratoře virologie AVČR (dosud nepublikované výsledky).

Je zřejmé, že sekvence OAS je postačující podmínkou pro iniciaci enkapsidace v podmínkách *in vivo*, není však podmínkou nezbytnou.



Obrázek 10: Sbalené virové částice, jejichž genom neobsahuje OAS. Obrázek byl pořízen pomocí TEM (Transmisní elektronový mikroskop).

Převzato z Laboratoře virologie AVČR (dosud nepublikované výsledky).



Obrázek 11 : Po vložení modifikované genomové informace virů do listů *Nicotiana benthamiana* byl pomocí GFP pozorován signál. Viry se i v tomto případě správně balily a šířily rostlinou. Jako první je uveden obrázek wild typu.

Převzato z Laboratoře virologie AVČR (dosud nepublikované výsledky).

Uvedené výsledky ukazují, že proces samosbalování virové kapsidy u viru tabákové mozaiky je složitější a komplexnější proces, který bude s největší pravděpodobností závislý i na jiných částech virového genomu, než bylo doposud předpokládáno. Experimenty zabývající se procesem samosbalování virové kapsidy *in vivo* budou bezpochyby určovat jeden ze směrů dalšího výzkumu, týkajícího se viru tabákové mozaiky.

## 5. Využití assembly částice TMV v rozvíjejících se biologických oborech

Speciální tvar kapsidy, tj polární tyčinka, dělá z viru tabákové mozaiky zajímavý objekt pro využití v nanotechnologiích, kde hraje velmi důležitou roli jako universální templát pro specifické chemické reakce, a to hlavně díky své stabilitě. K prvnímu propojení nanotechnologických metod a zkoumání viru tabákové mozaiky došlo roku 1999, kdy byl TMV použit jako templát pro tvorbu nanočástic mineralizací kapsidy (Shenton *et al.*, 1999).

Další výhodou částic založených na TMV je možnost určit jejich délku délkou enkapsidované RNA a skutečnost, že virová částice má vnitřní kanál. Struktura virového obalového proteinu je velmi dobře prozkoumána, což usnadňuje cílenou modifikaci důležitých povrchových aminokyselin (Schlick *et al.*, 2005).

### 5.1. Nanotechnologie

Nanotechnologie je souhrnný název pro široké spektrum nových vědních oborů a technologií, zabývajících se výzkumem v měřítku řádu nanometrů. Tyto vědní obory se zaměřují hlavně na konstrukci, syntézu, charakterizaci a použití materiálů a zařízení v nanoměřítku (Steinmetz & Evans, 2007).

#### 5.1.1. Částice obsahující kovové prvky

V případě nanočástic obsahujících molekuly kovů, slouží virová kapsida jako templát pro vazbu kovových atomů. Ty se se váží na koncové skupiny wild type coat proteinů (CP), které využívají jako ligand (Knez *et al.*, 2004). Pro tvorbu těchto částic jsou nejčastěji využívány sloučeniny zlata, platiny a stříbra, které se za normálních okolností váží na virovou kapsidu wild type viru. Anionty těchto prekurzorů ( $\text{AuCl}_4^-$  a  $\text{PtCl}_6^{2-}$ ) interagují přednostně s vnějším povrchem virové částice a vytváří kovový povlak, zatímco kationty stříbra ( $\text{Ag}^+$ ) jsou zabudovávány do vnitřní části centrální dutiny (Dujardin *et al.*, 2003). Pro lepší rozložení kovových prvků může být obalový protein viru tabákové mozaiky modifikován mutací nebo vložením specifického peptidu. Na amino-koncové části coat proteinů (CP) byly vloženy dvě molekuly cysteinu, díky kterým se zvětšil počet vazebných míst pro kovové částice. Tato modifikace zlepšuje vlastnosti virové kapsidy a molekuly kovů se díky ní váží hustěji a stabilněji (Lee *et al.*, 2005).

Tyto částice mají velký potenciál pro využití v mnohých odvětvích. Velmi často jsou zkoumány v disciplínách elektroniky. Např. byly použity jako elektrody při výrobě lithiových mikrobaterií, které by měly fungovat jako vysoce výkonné uložení elektrické energie (Pomerantseva *et al.*, 2012; Armand & Tarascon, 2008). Polarita a tvar částice jsou rovněž velmi vhodné pro tvorbu nanomagnetických materiálů pro přípravu elektronických pamětí nebo pro medicínskou diagnostiku (Bruckman *et al.*, 2014).

## **5.2. Medicínské využití**

### **5.2.1. Využití při léčbě a diagnostice nemocí**

Virus tabákové mozaiky má velký potenciál i pro využití jako transportní molekula pro vnášení chemoterapeutických léčiv. Tyto léky by měly být aplikovány přímo do buněk při léčbě různých forem rakoviny. Zde je využívána vlastnost viru vstupovat přímo do savčích buněk. Tato myšlenka ale vyžaduje ještě dlouhou fázi testování a vývoj, než bude moci být uplatněna v nanomedicině (Bruckman *et al.*, 2016). Nevýhodou použití viru pro tzv. targeted delivery je, že je povrch viru velmi imunogenní a je tak třeba ho zakrýt vhodným materiálem (například polyethylen glykolem (PEG) (Jokerst *et al.*, 2011).

### **5.2.2. Vakcinace, využití při přípravě vakcín**

Rostlinné systémy by mohly být díky svým vlastnostem použity také jako prostředky pro výrobu rekombinantních podjednotkových vakcín. Expresí požadovaného antigenního proteinu by byla možná po vložení tohoto genu do genomu rostlin nebo za použití rekombinantních virů. Nejlépe však kombinací obou postupů, kdy jsou některé funkce nezbytné pro virovou replikaci nebo movement kódovány nukleárním transgenem, a samotná vakcína je pak vložena do funkčně nekompletního rekombinantního viru. Tyto viry by měly sloužit jako přechodné (transientní) expresní vektory (Sala *et al.*, 2003). Vytvořené podjednotkové vakcíny mají mnoho potenciálních výhod, ve srovnání s dnešní produkcí v buněčných (savčích a bakteriálních) kulturách. Celý systém by byl mnohem ekonomičtější, než dnes používané metody. Zdravotní rizika vyplývající z kontaminace potenciálními lidskými patogeny nebo toxiny jsou minimalizována. Další výhodou může být odstranění procesu purifikace, pokud by vakcíny byly podávány perorálně, obsaženy v celých částech rostlin. Tyto vakcíny by mohly sloužit nejen lidem, byly by obzvláště výhodné pro veterinární použití (Daniell *et al.*, 2001; Dalsgaard *et al.*, 1997)

Do dnešní doby bylo provedeno velké množství experimentů zabývajících se výzkumem a vývojem těchto vakcín. Chtěla bych zmínit například využití subjednotkové

vakcíny proti viru Eboly při nedávné epidemii v roce 2014. Při této epidemii byl použit experimentální lék „ZMapp“. Konkrétně se jedná o směs tří humanizovaných monoklonálních protilátek, které jsou pro medicínské účely exprimovány v listech tabáku *Nicotiana benthamiana* pomocí virového vektoru odvozeného od TMV (Zhang *et al.*, 2014). Bylo provedeno několik experimentů na primátech, které prokázaly 100% účinnost tohoto preparátu a lék byl dokonce podán při poslední epidemii dvěma pacientům u kterých znovu potvrdil svůj terapeutický efekt. (Qiu *et al.*, 2014; WHO 2014). V současné době probíhají klinické testy vakcíny, které by měly prokázat její účinnost a bezpečnost pro lidskou potřebu (NIH, 2015; WHO, 2016). Lze očekávat, že se v co nejkratší možné době tato vakcína objeví na trhu.

Jako další potenciální možnost využití rostlin v léčbě bych chtěla zmínit personalizovanou léčbu non-Hodgkin lymfomu (McCormick *et al.*, 2008). Při vývoji vakcíny na tuto chorobu bylo použito 5 kg listů *Nicotiana benthamiana* pro výrobu 400-500 mg účinné látky, která by stačila na doživotní imunizaci jednoho pacienta. I tato vakcína je ale v současné době ve fázi klinických testů (Rybicki, 2009).

Vakcíny produkované v rostlinách by byly jistě velkým přínosem nejen ve vyspělých, ale hlavně v rozvojových zemích. Jejich budoucnost však záleží hlavně na dalším vývoji klinických testů a ostatních aspektech provázejících výzkum.



## 6. Závěr

Tato práce se věnuje shrnutí již existujících informací o molekulární podstatě interakce RNA viru tabákové mozaiky s obalovým proteinem a nastínění starších i aktuálních poznatků týkajících se sestavování virových částic v podmínkách *in vitro* a *in vivo*. Proces skládání virové částice *in vitro* byl v průběhu celého století velmi důkladně zkoumán. Bylo objasněno mnoho skutečností týkajících se molekulární podstaty celého mechanismu. Proto, abychom viry mohli využívat ve svůj prospěch je velmi důležité dobře znát proces samouspořádávání virové částice, protože tak můžeme velmi dobře kontrolovat šíření virové infekce. Studium procesu assembly/disassembly a znalosti o tom, jak ho kontrolovat a modifikovat nám mohou pomáhat k prevenci před samotnou virovou nákazou a mohou velkým dílem přispět k vývoji antivirových léků. Další rozvoj znalostí o viru tabákové mozaiky nám může pomoci pochopit široké spektrum dosud neobjasněných biologických procesů. Mohl by pomoci například při objasnění replikačních mechanismů jiných virů případně k ochraně proti nim.

I přes dlouhou dobu, po kterou je virus tabákové mozaiky zkoumán, zůstává mnoho informací stále neobjasněných. Nové biologické směry, které jsou v dnešní době soustředěny hlavně na nanotechnologické metody, by mohly pomoci k zodpovězení těchto otázek. Průběh disassembly virové částice není plně objasněn a k dnešnímu dni neexistuje detailní molekulární obraz tohoto procesu. Všechny informace, které o self assembly částice viru tabákové mozaiky máme, pramení z experimentů prováděných *in vitro*. Nenalezneme žádné publikace, které by obsahovaly informace o tom, jak celý mechanismus funguje přímo v rostlině a jestli se od mechanismu probíhajícího v *in vitro* podmínkách nějak liší. Podle experimentů, které byly provedeny v Laboratoři virologie na Ústavu experimentální botaniky rostlin AV ČR pod vedením Mgr. Tomáše Moravce, PhD., ke sbalení dochází i když částice neobsahuje počátek sbalování (OAS) nebo kóduje obalový protein jiného viru, který by neměl s RNA interagovat a k balení by docházet nemělo. Můžeme se tedy domnívat, že se virové částice v *in vivo* podmínkách chovají jinak. Tyto experimenty ale nebyly doposud publikovány a na první zdroje, které by obsahovaly odpověď na to, jak proces sbalování virové kapsidy opravdu probíhá v *in vivo* prostředí se teprve čeká.

Tato práce by, mimo jiné, měla sloužit i jako úvod k mé diplomové práci, ve které bych se tomuto problému velmi ráda více věnovala. Chtěla bych využít nových virových vektorů, založených na rostlinných DNA virech ze skupiny *Geminiviridae*, které umožňují snadno

vytvářet v jádru rostlinné buňky libovolné RNA, které mohou poté interagovat s cytoplasmatickým TMV obalovými proteiny.

## 7. Seznam použité literatury a zdrojů

(\*sekundární zdroj)

- Armand, M., & Tarascon, J. M. (2008).** Building better batteries. *Nature*, 451 (7179), s.652–657.
- Beijerinck, M. W. (1898).** Über ein *contagium vivum fluidum* als Ursache der Fleckenkrankheit der Tabaksblätter. *Verhandelingen der Koninklijke akademie van Wetenschappen te Amsterdam*, 5, s.3–21.[English translation published in 1942. Concerning a *contagium vivum fluidum* as cause of the spot disease of tobacco leaves.. *Phytopathological Classics* Number 7]
- Berg, R. H., Soto-aguilar, M., & Beachy, R. N. (2009).** A reassessment of the role of membranes in the TMV replication complex, 15, s.84–85.
- Boevink, P., & Oparka, J. K. (2005).** Virus-host interactions during movement processes. *Plant Physiology*, 138 (4), s.1815–1821.
- Bruckman, M. A., Czapar, A. E., VanMeter, A., Randolph, L. N., & Steinmetz, N. F. (2016).** Tobacco mosaic virus-based protein nanoparticles and nanorods for chemotherapy delivery targeting breast cancer. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. Dosud nepublikováno, umožněn pouze náhled přijatého textu.
- Bruckman, M. A., Randolph, L. N., VanMeter, A., Hern, S., Shoffstall, A. J., Taurog, R. E., & Steinmetz, N. F. (2014).** Biodistribution, pharmacokinetics, and blood compatibility of native and PEGylated tobacco mosaic virus nano-rods and -spheres in mice. *Virology*, 449, s.163–173.
- Buck, K. W. (1999).** Replication of tobacco mosaic virus RNA. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 354 (1383), s.613–627.
- \*Butler, P. J. (1999).** Self-assembly of tobacco mosaic virus: the role of an intermediate aggregate in generating both specificity and speed. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 354 (1383), s.537–550.
- Butler, P. J. G., Finch, J. T., & Zimmern, D. (1977).** Configuration of tobacco mosaic virus RNA during virus Assembly. *Nature*, 265, s.217–219.
- \*Butler, P. J. G., & Klug, A. (1978).** The Assembly of a Virus. *Sci. Am.*, 239 (5), s.62–69.
- Butler P, Klug A. (1971).** Assembly of the particle of tobacco mosaic virus from RNA and disks of protein. *Nature*, 229, s.47–50.
- Cann, A. J., (2005).** Principles of Molecular Virology. *Academic Press, University of Leicester, UK. 4th Edition*, s.80-81.
- \*Caspar, D. L. (1963).** Assembly and Stability of the Tobacco Mosaic Virus Particle. *Advances in protein chemistry*, 18, s.37–121.
- Caspar D. (1964).** Assembly and stability of the tobacco mosaic virus particle. *Advances in protein chemistry* 18, s.37–121.
- Dalsgaard, K., Uttenthal, A., Jones, T. D., Xu, F., Merryweather, A., Hamilton, W. D., Rodgers, P. B. (1997).** Plant-derived vaccine protects target animals against a viral disease. *Nature biotechnology*, 15 (3), s.248–252.
- Daniell, H., Streatfield, S. J., & Wycoff, K. (2001).** Medical molecular farming: Production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends in Plant Science*, 6 (5), s.219–226.
- Dawson, W. O., Beck, D. L., Knorr, D. A., & Grantham, G. L. (1986).** cDNA cloning of the complete genome of tobacco mosaic virus and production of infectious transcripts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(6), s.1832–1836.
- Dujardin, E., Peet, C., Stubbs, G., Culver, J. N., & Mann, S. (2003).** Organization of metallic nanoparticles using tobacco mosaic virus templates. *Nano Lett.*, 3(3), s.413–417.
- Fraenkel-Conrat, H., & C.Williams, R. (1955).** Reconstitution of active tobacco mosaic virus from its inactive protein and nucleic acid components. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 41(10), s.690–698.
- Franklin, R. E., Klug, A., & Holmes, K. C. (1957).** X-ray diffraction studies of the structure and morphology of tobacco mosaic virus. *The nature of viruses* (ed. G. E. W. Wolstenholme & E. C. P. Millar), s.39-52.

- Franklin, R. E., & Klug, A. (1955).** The splitting of layer lines in X-ray fibre diagrams of helical structures: application to tobacco mosaic virus. *Acta Crystallographica*, 8, s.777–780.
- Gleba, Y., Tusé, D. Giritch, A. (2013).** Plant viral vectors for delivery by *Agrobacterium*. *Current topics in microbiology and immunology*, 358, s.3–32.
- Gleba, Y., Klimyuk, V., & Marillonnet, S. (2005).** Magniffection - A new platform for expressing recombinant vaccines in plants. *Vaccine*, 23, s.2042–2048.
- Gleba, Y., Klimyuk, V., & Marillonnet, S. (2007).** Viral vectors for the expression of proteins in plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(2), s.134–141.
- Goelet, P., Lomonossoff, G. P., Butler, P. J. G., Akam, M. E., Gait, M. J., & Karn, J. (1982).** Nucleotide sequence of tobacco mosaic virus RNA. *Proc. Nad Acad. Sci. USA* 79, s.5818–5822.
- Guilley, H., Jonard, G., Kukla, B., & Richards, K. E. (1979).** Sequence of 1000 nucleotides at the 3' end of tobacco mosaic virus RNA. *Nucleic Acids Research*, 6(4), s.1287–1308.
- \*Harrison, B. D., & Wilson, T. M. A. (1999).** Milestones in the research on tobacco mosaic virus. *Philosophical Transactions: Biological Sciences*, 354(1383), s.521–529.
- Holt, C. A., & Beachy, R. N. (1991).** In vivo complementation of infectious transcripts tobacco mosaic virus cDNAs in transgenic from mutant plants. *Virology*, 181, s.109–117.
- Hwang, D. J., Roberts, I. M., & Wilson, T. M. (1994).** Expression of tobacco mosaic virus coat protein and assembly of pseudovirus particles in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(19), s.9067–9071.
- Chen, M. H., Sheng, J., Hind, G., Handa, A. K., & Citovsky, V. (2000).** Interaction between the tobacco mosaic virus movement protein and host cell pectin methylesterases is required for viral cell-to-cell movement. *The EMBO journal*, 19(5), s.913–920.
- Jokerst, J. V, Lobovkina, T., Zare, R. N., & Gambhir, S. S. (2011).** Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. *Nanomedicine (London, England)*, 6(4), s.715–728.
- Kausche, G. A., Pfankuch, E., & Ruska, H. (1939).** Die sichtbarmachung von pflanzlichem virus im Übermikroskop. *Die Naturwissenschaften*, 27(18), s.292–299.
- Kawakami, S., Watanabe, Y., & Beachy, R. N. (2004).** Tobacco mosaic virus infection spreads cell to cell as intact replication complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(16), s.6291–6296.
- King, A, M, Q (2012).** Virus taxonomy: Classification and nomenclature of viruses : Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Elsevier*.
- Klimyuk, V., Pogue, G., Herz, S., Butler, J., & Haydon, H. (2012).** Production of recombinant antigens and antibodies in *Nicotiana benthamiana* using Magniffection technology: GMP-Compliant facilities for Small- and Large-scale manufacturing. *Current topics in microbiology and immunology*, 375, s.127–154.
- Klug A., (1979).** The assembly of tobacco mosaic virus: structure and specificity. *The Harvey Lecture* 74,s.141-162
- Knez, M., Kern, K., Sumser, M., Bittner, M., Wege, C., Jeske, H., & Martin, P. (2004).** Spatially Selective Nucleation of Metal Clusters on the Tobacco Mosaic Virus. *Advanced Functional Materials*, 14(2), s.116–124.
- Lee, S.-Y., Royston, E., Culver, J. N., & Harris, M. T. (2005).** Improved metal cluster deposition on a genetically engineered tobacco mosaic virus template. *Nanotechnology*, 16(7), s.435-441.
- Marillonnet, S., Giritch, A., Gils, M., Kandzia, R., Klimyuk, V., & Gleba, Y. (2004).** In planta engineering of viral RNA replicons: Efficient assembly by recombination of DNA modules delivered by *Agrobacterium*. *Current Issue*, 101(18), s.6852–6857.
- Marillonnet, S., Thoeringer, C., Kandzia, R., Klimyuk, V., & Gleba, Y. (2005).** Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. *Nature biotechnology*, 23(6), s.718–723.
- Más, P., & Beachy, R. N. (1999).** Replication of tobacco mosaic virus on endoplasmic reticulum and role of the cytoskeleton and virus movement protein in intracellular distribution of viral RNA. *Journal of Cell Biology*, 147(5), s.945–958.
- Matthews, R., E., F., (2013).** Plant virology (2. přepracované vydání), *Academic Press*. s.201-203

- McCormick, A. A., Reddy, S., Reinl, S. J., Cameron, T. I., Czerwinski, D. K., Vojdani, F., Levy, R. (2008).** Plant-produced idiotypic vaccines for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma: Safety and immunogenicity in a phase clinical study. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(29), s.10131–10136.
- Namba, K., Pattanayek, R., & Stubbs, G. (1989).** Visualization of protein-nucleic acid interactions in a virus. *Journal of Molecular Biology*, 208(2), s.307–325.
- National Institutes of Health (2015).** Liberia-U.S. clinical research partnership opens trial to test Ebola treatments [cit. 14.8.2016].
- Dostupné z: <https://www.nih.gov/news-events/news-releases/liberia-us-clinical-research-partnership-opens-trial-test-ebola-treatments>
- Okada, Y., & Ohno, T. (1972).** Assembly mechanism of tobacco mosaic virus particle from its ribonucleic acid and protein. *Molecular and General Genetics MGG*, 114(3), s.205–213.
- Osman, T. A., & Buck, K. W. (1996).** Complete replication in vitro of tobacco mosaic virus RNA by a template dependent membrane-bound RNA polymerase. *Journal of Virology*, 70(9), s.6227–6234.
- Perham, R. N., & Wilson, T. M. A. (1976).** The polarity of stripping of coat protein subunits from the RNA in tobacco mosaic virus under alkaline conditions, 62(1), s.11–15.
- Perham, R. N., & Wilson, T. M. A. (1978).** The characterization of intermediates formed during the disassembly of tobacco mosaic virus at alkaline pH. *Virology*, 84(2), s.293–302.
- Pomerantseva, E., Gerasopoulos, K., Chen, X., Rubloff, G., & Ghodssi, R. (2012).** Electrochemical performance of the nanostructured biotemplated V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> cathode for lithium-ion batteries. *Journal of Power Sources*, 206, s.282–287.
- \*Porta, C., & Lomonossoff, G. P. (2002).** Viruses as vectors for the expression of foreign sequences in plants. *Biotechnology & genetic engineering reviews*, 19, s.245–291.
- Qiu, X., Wong, G., Audet, J., Bello, A., Fernando, L., Alimonti, J. B., Kobinger, G. P. (2014).** Reversion of advanced Ebola virus disease in nonhuman primates with ZMapp. *Nature*, 514(7520), s.47–53.
- \*Rybicki, E. (2009).** Third international conference of plant-based vaccines and antibodies. *Expert reviews vaccines*, 8(9), s.1151–1155.
- Sala, F., Rigano, M. M., Barbante, A., Basso, B., Walmsley, A. M., & Castiglione, S. (2003).** Vaccine antigen production in transgenic plants: Strategies, gene constructs and perspectives. *Vaccine*, 21(7-8), s.803–808.
- Salonen, A., Ahola, T., & Kaariainen, L. (2005).** Viral RNA replication in association with cellular membranes. *Curr Top Microbiol Immunol*, 285, s.139–173.
- Shenton, W., Mann, S., Douglas, T., Young, M., & Stubbs, G. (1999).** Inorganic-organic nanotube composites from template mineralization of tobacco mosaic virus. *Adv. Mater.*, 11(3), s.253–256.
- Shire, S. J., Steckert, J. J., Adams, M. L., & Schuster, T. M. (1979).** Kinetics and mechanism of tobacco mosaic virus assembly: direct measurement of relative rates of incorporation of 4S and 20S protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(6), s.2745–2749.
- Shivprasad, S., Pogue, G. P., Lewandowski, D. J., Hidalgo, J., Donson, J., Grill, L. K., & Dawson, W. O. (1999).** Heterologous sequences greatly affect foreign gene expression in tobacco mosaic virus-based vectors. *Virology*, 255(2), s.312–323.
- Schlick, T. L., Ding, Z., Kovacs, E. W., & Francis, M. B. (2005).** Dual-surface modification of the tobacco mosaic virus. *Journal of the American Chemical Society*, 127(11), s.3718–3723.
- Sleat, D. E., Gallic, D. R., Jefferson, R. A., Bevan, M. W., Turner, P. C., & Wilson, T. M. A. (1987).** Characterisation of the 5'-leader sequence of tobacco mosaic virus RNA as a general enhancer of translation in vitro. *Gene*, 60(2-3), s.217–225.
- Smith, M. L., Corbo, T., Bernales, J., Lindbo, J. A., Pogue, G. P., Palmer, K. E., & McCormick, A. A. (2007).** Assembly of trans-encapsidated recombinant viral vectors engineered from tobacco mosaic virus and semliki forest virus and their evaluation as immunogens. *Virology*, 358(2), s.321–333.
- Steinmetz, N., F., Evans, D., J. (2007).** Utilisation of plant viruses in bionanotechnology. *The Royal Society of Chemistry*, 5, s.2891–2902.

- Stubbs, G., Warren, S., Holmes, K. (1977).** Structure of RNA and RNA binding site in tobacco mosaic virus from 4-Å map calculated from X-ray fibre diagrams. *Nature*, 267, 216–221.
- Stubbs, G. (1999).** Tobacco mosaic virus particle structure and the initiation of disassembly. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 354(1383), s.551–557
- Watson, J. D. (1954).** The structure of tobacco mosaic virus. *Biochimica et Biophysica Acta*, 13, s.10–19.
- World Health Organization (2016).** Table of drug clinical trials [cit. 13.8.2016]. Dostupné z: [http://www.who.int/medicines/ebola-treatment/ebola\\_drug\\_clinicaltrials/en/](http://www.who.int/medicines/ebola-treatment/ebola_drug_clinicaltrials/en/)
- World Health Organization (2014).** Potential Ebola therapies and vaccines [cit.14.8.2016].Dostupné z: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/137590/1/WHO\\_EVD\\_HIS\\_EMP\\_14.1\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/137590/1/WHO_EVD_HIS_EMP_14.1_eng.pdf?ua=1)
- Wu, L., Jiang, L., Zhou, Z., Fan, J., Zhang, Q., Zhu, H., Xu, Z. (2003).** Expression of foot-and-mouth disease virus epitopes in tobacco by a tobacco mosaic virus-based vector. *Vaccine*, 21(27–30), s.4390–4398.
- Zhang, Y. F., Li, D. P., Jin, X., & Huang, Z. (2014).** Fighting Ebola with ZMapp: spotlight on plant-made antibody. *Science China Life Sciences*, 57(10), s.987–988.
- Zimmern, D. (1977).** The nucleotide sequence at the origin for assembly on tobacco mosaic virus RNA. *Cell*, 11(3), s.463–82.
- Zimmern, D., & Butler, P. J. G. (1977).** The isolation of tobacco mosaic virus RNA fragments containing the origin for viral assembly. *Cell*, 11(3), s.455–462.
- Zimmern, D., & Wilson, T. M. A. (1976).** Location of the origin for viral assembly on tobacco mosaic virus RNA and its relation to stable fragments. *FEBS Lett.*, 71(2), s.294–298.

## 8. Seznam použitých ilustrací

**Obrázek 1:** Butler, P. J. G., & Klug, A. (1978). The Assembly of a Virus. *Sci. Am.*, 239(5), 62–69.

**Obrázek 2:** Cann, A. J., 2005. Principles of Molecular Virology. *Academic Press, University of Leicester, UK. 4th Edition, s.80-81.*

**Obrázek 3:** Porta, C., & Lomonossoff, G. P. (2002). Viruses as vectors for the expression of foreign sequences in plants. *Biotechnology & genetic engineering reviews*, 19(January 2014), s.245–291.

**Obrázek 4:** Marillonnet, S., Giritch, A., Gils, M., Kandzia, R., Klimyuk, V., & Gleba, Y. (2004). In planta engineering of viral RNA replicons: Efficient assembly by recombination of DNA modules delivered by *Agrobacterium*. *Current Issue*, 101(18), s.6852–6857.

**Obrázek 5,6:** Klug, A. (1999). The tobacco mosaic virus particle: structure and assembly. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B-Biol. Sci.*, 354(1383), s.531–535.

**Obrázek 7:** Butler, P. J. (1999). Self-assembly of tobacco mosaic virus: the role of an intermediate aggregate in generating both specificity and speed. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 354 (1383), s.537–550.

**Obrázek 8, 9, 10, 11:** Moravec, T. Laboratoř virologie AVČR (Dosud nepublikované výsledky)